

لا يعار.
Exclus du Prêt.

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université Mohamed Seddik
Ben Yahia- Jijel
Faculté des Sciences Exactes et Informatique
Département de Chimie



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de **Master Académique en Chimie**

Option : **Chimie Pharmaceutique**

Présenté par :

LAHMER MERYEM & KLIKHA KENZA

Thème:

**Étude de l'activité antibactérienne & antioxydante
des dérivés de benzothiazole portant des fonctions
urée et thiourée**

Soutenu le : 02 /07/2017

Devant les membres du jury :

Dr. KHALIL SAHRA

Université de Jijel

Président

Dr. KAMEL HARROUCHE

Université de Jijel

Encadreur

Dr. NADJIB KIHAL

Université de Jijel

Examineur



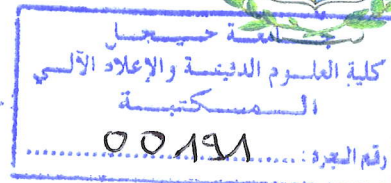
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université Mohamed Seddik
Ben Yahia- Jijel
Faculté des Sciences Exactes et Informatique
Département de Chimie



Mémoire



En vue de l'obtention du diplôme de Master Académique en Chimie

Option : Chimie Pharmaceutique

Présenté par : M. chi. Phor. 03/17

LAHMER MERYEM & KLIKHA KENZA

Thème:

Étude de l'activité antibactérienne & antioxydante
des dérivés de benzothiazole portant des fonctions
urée et thiourée

01
01

Soutenu le : 02 /07/2017

Devant les membres du jury :

Dr. KHALIL SAHRA

Université de Jijel

Président

Dr. KAMEL HARROUCHE

Université de Jijel

Encadreur

Dr. NADJIB KIHAL

Université de Jijel

Examineur

Année Universitaire : 2016-2017

Remerciements

Au terme de ce travail, nous remercions Dieu le tout puissant d'avoir donné le courage, la patience et la santé afin d'achever ce modeste travail dans les meilleures conditions.

*Le présent travail n'aurait pu être réalisé sans l'aide et l'orientation prodiguées par Dr. **Kamel Harrouche**, à qui nous adressons tous nos remerciements. A cet effet, nous tenons à souligner la richesse de ses conseils et de ses recommandations, joignant harmonie et rigueur scientifique.*

*Nous remercions Dr. **Nadjib Kihal**, d'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence du jury.*

*Mes vifs remerciements à Dr **Khalil Sahra**, d'avoir fait l'honneur d'accepter d'être membre du jury.*

*Nous tenons également à remercier Dr. **Bouider Nafila**, pour l'aide et les conseils qu'elle a toujours donnés.*

Nous remercions Madame Hadia, ainsi que Monsieur Riyad ingénieur au Laboratoire de Pharmacologie et phytochimie pour leurs supports et vos encouragements

Nous tenons également à remercier tout les membres du laboratoire TaherHbila, Meriem Kemel, Karima Bousafi de leurs conseils ou leur soutien moraux, qu'ils trouvent dans ces quelques lignes l'expression de nos remerciements les plus vifs

Dédicaces

Je dédie ce travail

À mes parents qu'ils trouvent ici toute ma gratitude pour leur soutien tout le long de ce travail.

À mes chers frères et sœurs, Mohammed, Abderrezak, Hassina, Yasmina, Houda, Sabrina, Salima, Hanane, Rania.

*À mes collègues de promotion master Chimie pharmaceutique et surtout :
Kenza, Fatima.*

À tous ceux qui m'aiment

Meryem

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

À mes parents qui ont consenti d'énormes sacrifices pour me voir réussir, pour l'enseignement de la vie et pour l'éducation qu'ils n'ont cessé de me prodiguer durant mes études.

À mes chers frères : Mohammed, Mehdi, Hichem et Amer

Et sœurs : Widad, Dounia, Aida et Amel

À toute ma famille

À mes amies de promotion de chimie pharmaceutique surtout: Lahmer Mereyem, Farour Fouzia, Aiche Wahiba et Dellouche Fatima.

Enfin, il est de mon devoir de remercier tous ceux et celles, nombreux qui ont contribué à la réalisation de ce travail, qu'ils trouvent ici l'expression de ma reconnaissance.

Kenza

Liste des abréviations

C°	: Température en degré Celsius
µg	: Microgramme
µl	: Microlitre
30S, 50S	: Sous - unités du ribosome bactérien
16S, 23S	: Sous - unités du ribosome bactérien
A	: Absorbance
ABTS	: L'acide 2,2- azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)
ADN	: Acide Désoxyribo-Nucléique
ARN	: Acide Ribo-Nucléique
ARNm	: ARN messenger
ARNr	: ARN ribosomal
ATCC	: American Type Culture Collection
CAT	: Catalase
CI ₅₀	: Concentration inhibitrice à 50%
CMI	: Concentration minimale inhibitrice
DMSO	: Diméthylsulfoxyde
D.O	: densité optique
DPPH	: 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl
ERO	: Espèce réactive de l'oxygène
FRAP	: Ferric reducing- antioxidant power
GPx	: Glutathion peroxydase.
GR	: Glutathion réductase



GSH	: Glutathion réduit
GSSG	: Glutathion oxydé.
HOCl	: Acide hypochlorique
H ₂ O ₂	: Peroxyde d'hydrogène
I%	: Pourcentage d'inhibition
LOO [•]	: Radical peroxyde lipidique
LOOH	: Hydroperoxyde lipidique
MeOH	: Méthanol
mg	: Milligramme
min	: Minute
ml	: Millilitre
mm	: Millimètre
NADPH	: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (réduit)
nd	: Non déterminée
NO [•]	: Monoxyde d'azote
O ₂ ⁻	: Anion superoxyde.
¹ O ₂	: Oxygène singulet
OH [•]	: Radical hydroxyl.
ONOO ⁻	: Peroxynitrite
RO [•]	: Radical alkoxyde
ROO [•]	: Radical peroxyde
ROOH	: Hydroperoxyde organique
SOD	: Superoxyde dismutase

<i>Liste des tableaux</i>		
Tableau 01 :	Les différents types des espèces réactives de l'oxygène.....	13
Tableau 02 :	Principales enzymes du système de défenses antioxydants enzymatiques.....	17
Tableau 03 :	Préparation de la solution mère et les solutions filles.....	25
Tableau 04 :	Diamètres des zones d'inhibition pour les produits de la série A.....	28
Tableau 05 :	Diamètres des zones d'inhibition pour les produits de la série B.....	29
Tableau 06 :	Diamètres des zones d'inhibition pour le diméthylsulfoxyde et l'antibiotique.....	31
Tableau 07 :	Concentration minimale inhibitrice des produits de la série A.....	32
Tableau 08 :	Concentration minimale inhibitrice des produits de la série B.....	32
Tableau 09 :	Valeurs des concentrations inhibitrices des produits de la série A.....	38
Tableau 10 :	Valeurs des concentrations inhibitrices des produits de la série B.....	38

<i>Liste des figures</i>		
Figure 01 :	Structure générale d'une bactérie.....	3
Figure 02 :	Structure comparée des deux types de paroi bactérienne.....	3
Figure 03 :	Structure chimique de fosfomycine.....	6
Figure 04 :	Structure chimique de sulfamides.....	7
Figure 05 :	Structure de base des quinolones.....	7
Figure 06 :	Structure chimique de 5-nitro-imidazole.....	7
Figure 07 :	Structure chimique de chloramphénicol.....	8
Figure 08 :	Structure chimique de tétracyclines.....	9
Figure 09 :	Déséquilibre de la balance entre antioxydants et les ERO.....	15
Figure 10 :	Structure chimique de glutathion.....	17
Figure 11 :	structure chimique de Coenzyme Q10.....	18
Figure 12 :	Structure chimique de vitamine E.....	19
Figure 13 :	Structure chimique de vitamine C.....	19
Figure 14 :	Exemples de carotène et xanthophylle.....	20
Figure 15 :	Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.....	21
Figure 16 :	Structure chimique de la Ciprofloxacine.....	25
Figure17(a):	Les pourcentages d'inhibition de l'acide ascorbique et les produits H21, H210, H620, H61, H411	36
Figure17(b):	Les pourcentages d'inhibition des produits H74, H51, H511, H58....	37

Tables des matières

Remerciements	
Dédicace	
Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Introduction générale.....	1
Partie I : Partie bibliographique	
Chapitre I : Étude de l'activité antibactérienne	
I-1- Généralité sur les bactéries.....	2
I.1.1. Définition et classification des bactéries	2
I.1.2. Structure d'une bactérie.....	2
I.2. Les antibiotiques.....	4
I.2.1. Historique des antibiotiques	4
I.2.2. Définition des antibiotiques	5
I.2.3. Classification et mécanisme d'action d'antibiotiques	5
I.2.3.1. Antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi bactérienne.....	5
I.2.3.2. Antibiotiques actifs sur les membranes bactériennes.....	6
I.2.3.3. Antibiotiques inhibant la synthèse ou le fonctionnement de l'ADN....	6
I.2.3.4. Antibiotiques inhibant la synthèse protéique.....	8
I.2.4. Résistance aux antibiotiques	9
I.2.4.1. Définition la résistance aux antibiotiques	9
I.2.4.2. Types de résistance	9
I.1.4.3. Mécanismes de résistance.....	10
I.3. Méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne.....	11
I.3.1. La méthode de diffusion sur disque	11
I.3.2. Les méthodes de dilution	11
I.3.3. La méthode de E – test	11
Chapitre II : Étude de l'activité antioxydante	
II.1. Les radicaux libres.....	13
II.1.1. Définition et types des radicaux libres	13
II.1.2. Sources des radicaux libres	14
II.1.3. Rôles physiologique des radicaux libres	14

II.1.3. Rôles physiologique des radicaux libres	14
II.2. Stress oxydant	14
II.2.1. Définition	14
II.2.2. Les conséquences du stress oxydant	15
II.2.3. Les antioxydants	16
II.2.3.1. Définition	16
II.2.3.2. Classification et mécanisme d'action des antioxydants	16
II.3.2.1. Les antioxydants enzymatiques.....	17
II.3.2.2. Les antioxydants non enzymatiques.....	17
II.3. Quelques méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante	20
II.3.1. Test de piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH•).....	20
II.3.2. Test de piégeage du radical- cation (ABTS ^{•+}).....	21
II.3.3 Test de la réduction du fer FRAP (Ferric reducing-antioxidant power)	21
III.3.4. Chélation du fer	21

Partie II : Partie Expérimentale

Chapitre I: Évaluation de l'activité antibactérienne et antioxydante

I.1. Matériels	23
I.1.1. Matériel biologique	23
I.1.2. Milieux de culture	24
I.1.3. Réactifs chimiques et solvants	24
I.1.4. Produits testés.....	24
I.2. Méthodes	24
I.2.1. Le test de l'activité antibactérienne.....	24
I.2.1.1. Préparation des solutions testées.....	25
I.2.1.2. Repiquage des souches bactériennes	25
I.2.1.3. Préparation des disques	25
I.2.1.4. Préparation de l'inoculum	25
I.2.1.5. L'ensemencement.....	26
I.2.1.6. Disposition des disques	26
I.2.1.7. Incubation et lecture	26
I.2.2. Le test de l'activité antioxydante.....	26
I.2.2.1. Préparation des solutions.....	26

I.2.2.2. Mode opératoire	26
I.2.2.3. Expression des résultats	27
I.3. Résultats et discussion	28
I.3.1. Le test de l'activité antibactérienne	28
I.3.1.1. Détermination des diamètres des zones d'inhibition	28
I.3.1.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices	32
I.3.1.3. Discussion	33
I.3.2. Le test de l'activité antioxydante	35
I.3.2.1. Le pourcentage d'inhibition	35
I.3.2.2. La concentration inhibitrice CI_{50}	37
I.3.2.3. Discussion.....	40
Conclusion générale.....	43
Références bibliographiques	
Annexes	

Introduction
générale

Introduction générale et objectif du travail

Les hétérocycles sont des composés chimiques cycliques contenant au moins un hétéroatome comme l'oxygène, l'azote, le soufre, etc... [1]. Ils constituent le squelette de base pour une grande variété de composés d'intérêt chimique, biologique, pharmacologique et industriel. D'un point de vue pharmacologique, les benzohétérocycles, tels que les benzothiazoles possèdent de nombreuses activités pharmacologiques telle que l'activité antitumorale, antimicrobienne, anti-inflammatoire, anticonvulsante, anthelminthique, ils ont aussi des activités antivirales, antidiabétiques et antioxydantes [2]. Ces propriétés confèrent aux benzothiazoles une place prépondérante dans le domaine de la chimie médicinale.

Notre travail constitue une continuité des travaux réalisés autour des dérivés de benzothiazoles portant une fonction urée ou thiourée, dont une soixantaine de molécules ont été synthétisés et testés sur deux modèles pharmacologiques [3]. Dans ce contexte deux autres tests pharmacologiques *in vitro* ont été proposés, il s'agit de l'activité antibactérienne et l'activité antioxydante.

Le travail présenté dans ce mémoire est divisé en deux parties détaillées avec une conclusion générale, référence bibliographique et annexes :

- Dans la première partie on présente une recherche bibliographique, qui sera composée de deux chapitres : le premier chapitre est consacré à l'étude de l'activité antibactérienne, tandis que le deuxième chapitre sera réservé à une approche sur l'étude de l'activité antioxydante.

- Dans la seconde partie, on aborde tous les travaux expérimentaux réalisés au cours de ce travail, y compris les matériels, les méthodes utilisées dans l'évaluation des deux activités, et ainsi que les résultats obtenus et leurs interprétations.

Une conclusion générale qui résume l'ensemble des résultats obtenus sera exposée en fin de ce mémoire.

Partie I
Partie Bibliographique

Chapitre I
Étude de l'activité antibactérienne

I.1. Généralités sur les bactéries :

I.1.1. Définition et classification des bactéries :

Les bactéries sont des organismes unicellulaires dont la structure ne comporte pas de noyau (procaryote) dont le génome est constitué d'ADN. Celui-ci consiste en un seul chromosome, et on note éventuellement la présence de plasmides (petit morceau d'ADN circulaire) [4]. Elles ont généralement une taille variée entre 1 à 10µm, et sont donc invisibles à l'œil.

La classification des cellules bactériennes fondée essentiellement sur les critères suivantes :

- **Le type de paroi** : la coloration de gram utilisée pour classer les bactéries en deux groupes :
 - Les bactéries à gram positif : qui retiennent la coloration violette.
 - Les bactéries à gram négatif : qui ne retiennent aucune coloration.
- **La forme** : les bactéries sont regroupées selon trois formes :
 - Forme sphérique : on les appelle coques ou cocci.
 - Forme cylindrique : on les appelle les bâtonnets ou bacilles.
 - Forme spiralée : nommé spirilles.
- **Le comportement en relation avec l'oxygène libre** : Les bactéries réagissent à l'oxygène selon quatre modes respiratoires :
 - 1- aérobies stricts : ne se développe qu'en présence d'oxygène.
 - 2 - anaérobies stricts : ne se développent qu'en absence d'oxygène libre ou en présence de teneurs très faibles.
 - 3 - aérobies anaérobies facultatives : peuvent croître en présence ou en absence d'oxygène.
 - 4 - microaérophiles : croissent en présence d'une faible quantité d'oxygène [5].

I.1.2. Structure d'une bactérie :

Une bactérie comporte généralement les éléments suivants (Figure 01) :

1- L'enveloppe bactérienne :

a) **La membrane cytoplasmique** : est une bicouche phospholipidique située entre le cytoplasme et les structures externes, elle contient des protéines (intégrales et périphériques) jouant un rôle dans le transport, le métabolisme énergétique et la réception des signaux.

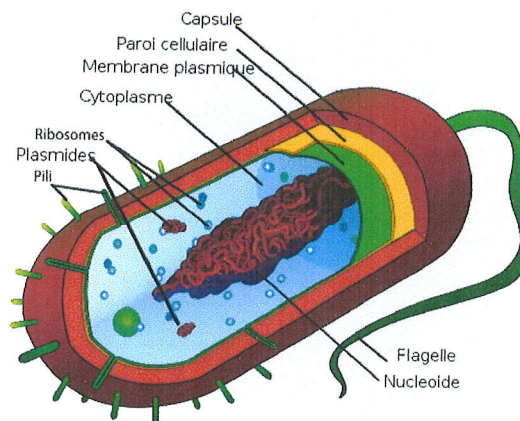


Figure 01 : Structure générale d'une bactérie.

b) La paroi bactérienne : C'est une barrière rigide présente chez presque toutes les bactéries assurant l'intégrité de la bactérie, son constituant principale est le peptidoglycane. La paroi protège la cellule bactérienne contre les agents extérieurs et la forte pression osmotique interne et donne sa forme. La structure de paroi est variée entre les germes à Gram négatif et les germes à Gram positif (Figure 02) :

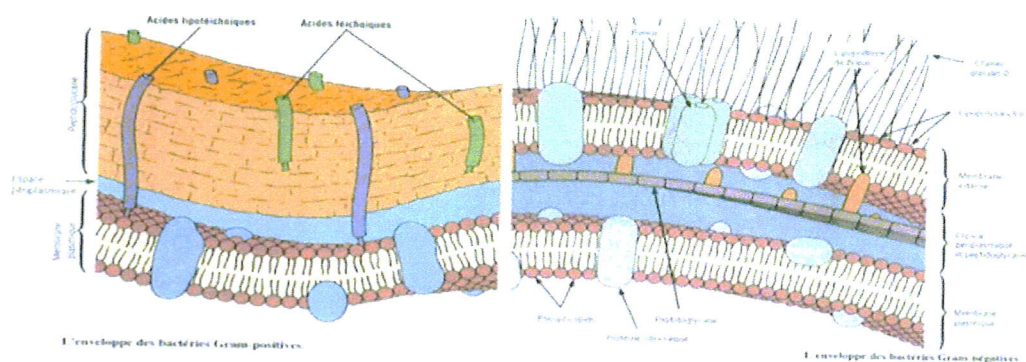


Figure 02 : structure comparée des deux types de paroi bactérienne.

La paroi chez les germes à Gram positif est épaisse et homogène, elle est constituée principalement de peptidoglycane (90%), des acides teichoïques et des acides lipoteichoïques, tandis que chez les germes à Gram négatif la paroi est plus complexe et comprend deux membranes : la membrane interne et la membrane externe séparées par le périplasme.

2- Structures internes :

a) Appareil nucléaire : Constitué d'acide desoxyribonucléique (ADN) qui est le support de l'information génétique. L'ADN bactérien est constitué d'un seul chromosome de taille

différente selon les différentes espèces de bactéries, il est circulaire, légèrement enroulé et associé à des protéines semblables aux histones des cellules eucaryotes. Certaines bactéries contiennent aussi de petites molécules d'ADN extrachromosomiques, appelées plasmides.

b) Le Cytoplasme : le cytoplasme des bactéries est aqueux, contenant d'acides ribonucléiques(ARN) et de protéines nécessaires au fonctionnement de la cellule. Les principales structures communes à toutes les bactéries que l'on trouve dans le cytoplasme sont les ribosomes. Les ribosomes sont constitués de protéines ribosomales et d'ARN divisés en deux sous-unités : sous-unité 30S est constituée d'ARNr 16S, sous unité 50S est constituée d'ARNr 23S [6].

3- Structures inconstantes :

- **La capsule :** est un enduit excrété par certaines bactéries, elle protège les bactéries de la dessiccation et de la phagocytose.
- **Cils ou flagelles :** sont des appendices filamenteux, composés entièrement de protéines, Ils constituent les organes de locomotion pour les bactéries qui en possèdent.
- **Les pili ou fimbriae :** Ce sont aussi des filaments, beaucoup plus courts et plus fins que les flagelles. Ils permettent aux bactéries de mieux adhérer à certaines surfaces ou tissus cellulaires [7].

I.2. Les antibiotiques :

I.2.1. Historique des antibiotiques :

Historiquement, le premier antibiotique découvert est la pénicilline, découverte par le Français Ernest Duchesne en 1897. En 1928 Alexander Fleming qui effectuait des recherches sur les staphylocoques, remarqua dans l'une de ses boîtes de pétri que les colonies de staphylocoques proches de la moisissure *Penicillium* étaient mortes.

La découverte de pénicilline a ouvert la voie à l'identification de nombreuses autres classes d'antibiotiques d'origine naturelle, incluant les tétracyclines(1948),les aminoglycosides (streptomycine en 1943) les macrolides (erythromycine en 1952), les glycopeptides (vancomycine en 1956) et les β -lactamines de deuxième génération (céphalosporine 1962), cette période représente l'âge d'or de l'antibiothérapie [8].



Après cette période d'autres antibiotiques d'origine synthétique ou hémi-synthétiques ont été mis sur le marché.

I.2.2. Définition des antibiotiques :

Le terme antibiotique issu du Grec *antibios* qui signifie « contre la vie ». Il a été proposé par René Dubos en 1940 et défini après clairement par le microbiologiste Américain Selman Abraham Waksman en 1943 : « toutes les substances chimiques produites par des micro-organismes capables d'inhiber le développement et de détruire les bactéries et d'autres organismes » [9].

En générale, le terme « antibiotique » désigné les produits chimiques élaborés par des micro-organismes ou produits par synthèse capables de détruire ou d'empêcher la croissance des micro-organismes plus particulièrement des bactéries.

I.2.3. Classification et mécanismes d'action d'antibiotiques :

I.2.3.1. Antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi bactérienne :

- **β -lactamines :**

Les β lactamines sont des analogues structuraux de substrats des enzymes synthétisant le peptidoglycane (transpeptidase, carboxypeptidase) dont la structure de base est le cycle β -lactame, elles forment un lien covalent avec l'enzyme transpeptidase conduisant à la formation d'un complexe enzyme-produit insoluble et empêchent donc toute activité de celui-ci.

- **Glycopeptides :**

Les glycopeptides sont des molécules complexes, constituées d'un heptapeptide cyclique sur lequel viennent se greffer des sucres (mannose et glucosamine dans la teicoplanine ; glucose et vancosamine dans la vancomycine). Ils inhibent la dernière étape de la synthèse du peptidoglycane en contractant des liaisons hydrogène avec le dipeptide DAla-DAla situé à l'extrémité des précurseurs pentapeptidique du peptidoglycane et inhibent par l'encombrement stérique qu'ils créent l'action de la transpeptidase et de la transglycosylase, bloquant ainsi l'élongation du peptidoglycane [10].

- **Fosfomycine :**

La fosfomycine appartient à la famille des acides phosphoniques (Figure 03). Elle se comporte comme un analogue du phosphoénolpyruvate et inhibe la pyruvyl- transférase enzyme impliquée dans la synthèse du précurseur du peptidoglycane [11].

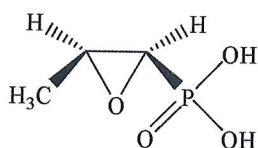


Figure 03 : Structure chimique de fosfomycine.

I.2.3.2 Antibiotiques actifs sur les membranes bactériennes :

- **Daptomycine :**

La daptomycine est un lipopeptide cyclique polyanionique. Son activité est limitée aux bactéries à Gram +, elle possède une activité bactéricide rapide par l'insertion de la partie lipophile dans la membrane cellulaire bactérienne (mécanisme calcium-dépendant), entraînant une dépolarisation membranaire rapide et un efflux d'ion potassium. Cela conduit à la mort de la bactérie [12].

- **Polymyxines :**

Les polymyxines sont des molécules polycationiques amphipathiques, possédant 5 groupements aminés non masqués, grâce à leur caractère amphipathique, elles pénètrent dans la bactérie et s'insèrent parmi les phospholipides de la membrane cytoplasmique, perturbant ainsi la perméabilité membranaire. Cela conduit à un relargage du contenu intracytoplasmique et à la mort de la bactérie. Son activité est limitée aux bactéries à Gram- [13].

I.2.3.3. Antibiotiques inhibant la synthèse ou le fonctionnement de l'ADN :

- **Rifampicines :**

Est une molécule lipophile comporte deux cycles aromatiques reliés par une longue chaîne, elle bloque la transcription de l'ADN en ARN messager par sa fixation covalente sur la sous-unité β de l'ARN polymérase ADN-dépendante bactérienne. L'effet bactéricide de rifampicine pourrait s'expliquer par la stabilité de cette liaison covalente et par la formation de radicaux libres (par oxydation du noyau quinone de la rifampicine) toxiques pour l'ADN bactérien.

- **Sulfamides :**

Les sulfamides sont des dérivés de l'acide para-aminobenzène sulfonique (Figure 04), et de ce fait inhibent de façon compétitive la synthèse d'acide dihydrofolique qui est nécessaire à la synthèse de l'acide tétrahydrofolique un cofacteur de la synthèse ultérieure des bases puriques et pyrimidiques [11]. La sélectivité d'action des sulfamidés provient du

fait que les bactéries doivent synthétiser leur acide folique par cette voie métabolique, alors que les eucaryotes assimilent directement l'acide folique apporté par l'alimentation.

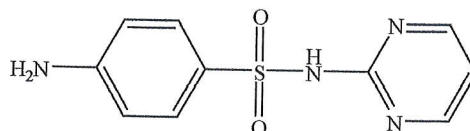


Figure 04 : structure chimique de sulfamides.

• **Quinolones :**

Sont des dérivés de l'acides carboxyliques hétérocycliques diversement substitués (Figure 05). Ces médicaments sont appelés «poisons de topoisomérase», ils se lient de façon non covalente à l'interface d'enzyme-ADN (topoisomérase de type II) dans le site active clivage-ligation en formant un complexe ternaire ADN-gyrase-quinolone qui inhibe la ligation du double brin d'ADN après coupure [14], ce mécanisme est suivie par une inhibition rapide de la synthèse de l'ADN et la mort de la bactérie.

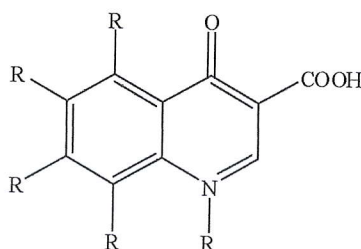


Figure 05 : Structure de base des quinolones.

• **Nitro-imidazolés :**

Les nitroimidazoles possédant comme structure chimique un cycle d'imidazole portant un substituant nitro qui confère à ces molécules l'activité antibactérienne (Figure 06).

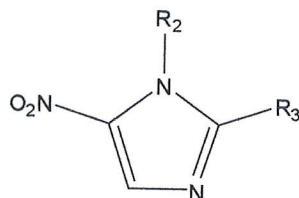


Figure 06 : Structure chimique de 5-nitro-imidazole.

Le mode d'action des nitro-imidazolés contient 4 phases [15] :

1- pénétration par simple diffusion dans la bactérie.

- 2- réduction du groupe nitro par les transporteurs d'électrons intra-cytoplasmiques.
- 3- effet cytotoxique du produit réduit après interaction avec des cibles intracellulaire.
- 4- libération des produits finis inactifs.

I.2.3.4. Antibiotiques inhibant la synthèse protéique :

• Aminosides :

Sont des antibiotiques hydrosolubles de type cationique qui se fixent sur l'ARNr 16 S, au niveau de la sous-unité 30S du ribosome bactérien, cette fixation entraîne une altération dans la traduction de l'ARNm en protéines, donnant comme résultat des protéines anormales incorporées dans la membrane cytoplasmique, qui va perdre son intégrité.

• Phénicolés :

Les phénicolés sont des dérivés de l'acide dichloroacétique, porteurs aussi d'un phényl substitué (Figure 07). Le groupement dichloroacétamide est important pour l'activité antibiotique. Les phénicolés se fixent à la sous-unité 50s des ribosomes bactériens. Ils inhibent la synthèse protéique en réduisant l'activité catalytique de la peptidyl-transférase, et donc l'élongation des peptides [16].

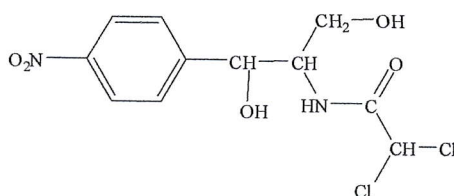


Figure 07 : Structure chimique de chloramphénicol.

• Macrolides :

Les macrolides sont des molécules basiques constitués par un macrocycle porteur d'une fonction lactone, sur laquelle viennent se greffer deux ou plusieurs sucres dont l'un est aminé. Ils se fixent sur l'ARN ribosomal 23 S de la sous-unité 50 S entraînant ainsi une inhibition de la phase d'élongation de la synthèse protéique.

• Acide fusidique :

L'acide fusidique agit en inhibant la synthèse protéique par blocage de la phase d'élongation de la synthèse protéique [11].

• Tétracyclines :

Les tétracyclines doivent leur nom à leur structure tétracyclique commune (noyau naphthalène-carboxamide) (Figure 08). Les tétracyclines inhibent la synthèse protéique en se liant à la sous-unité 30S de l'ARN 16S et inhibent l'étape de traduction de la synthèse protéique [10].

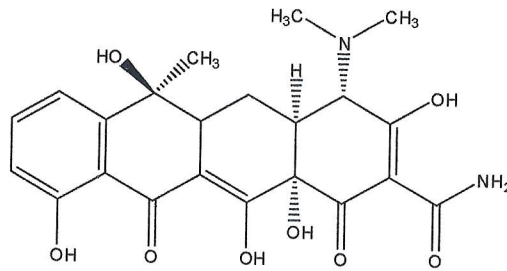


Figure 08 : Structure chimique de tétracyclines.

I.2.4. Résistance aux antibiotiques :

Après une période de forte efficacité contre les maladies infectieuses, les antibiotiques se présentent de moins en moins efficaces face à certaines infections bactériennes. Dès 1940, et juste après la découverte de la pénicilline, Abraham et Chain avaient mis en évidence l'existence de résistance à cet antibiotique chez *Escherichia coli*. Les bactéries s'adaptent aux antibiotiques et deviennent résistantes.

I.2.4.1. Définition de la résistance aux antibiotiques :

La résistance aux antibiotiques ou l'antibiorésistance est la capacité d'une bactérie à résister à l'action d'un antibiotique, c.-à-d. sa capacité de croître, se multiplier malgré la présence de l'antibiotique. En général une souche est résistante quand [17]:

- la concentration d'antibiotique qu'elle est capable de supporter est notablement plus élevée que la concentration qu'elle est possible d'atteindre *in vivo*.
- Elle supporte une concentration d'antibiotique notablement plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres souches de la même espèce ou des individus de la même culture.

I.2.4.2. Types de résistance :

Les bactéries deviennent résistantes aux antibiotiques par différentes manières, quelques micro-organismes sont naturellement résistants mais d'autres, ont une résistance acquise :

- **La résistance naturelle (intrinsèque) :** est celle qui est présente dans toutes les souches de l'espèce ou de genre considérée. Elle est censée préexister à l'usage des antibiotiques. Elle constitue donc une caractéristique propre à l'espèce et délimite en fait le spectre d'activité des antibiotiques. On parle ici d'espèces insensibles. À titre d'exemple, les mycoplasmes, bactéries sans paroi, sont naturellement résistants aux antibiotiques qui agissent sur la paroi des bactéries.

- **La résistance acquise :** résulte, quant à elle, de l'utilisation des antibiotiques et ne concerne qu'un certain nombre de souches de la même espèce ou du même genre, qui se distinguent ainsi des souches sauvages au sein d'une espèce bactérienne donnée. On parle donc ici de souches insensibles [18].

I.1.4.3. Mécanismes de résistances:

Pour lutter contre l'action létale des antibiotiques, les bactéries ont élaboré plusieurs stratégies de résistance, qui s'appuient sur trois types de mécanismes de résistance :

➤ **Inactivation enzymatique de l'antibiotique :**

L'inactivation enzymatique de l'antibiotique représente le principal mécanisme de résistance des bêta-lactames, des aminoglycosides et des phénicolés. Il consiste en une modification de noyau actif de l'antibiotique par clivage ou par addition d'un groupement chimique par l'enzyme, empêchant de ce fait la fixation de l'antibiotique sur sa cible et provoquant une perte d'activité [19]. Comme exemple on peut citer l'inactivation enzymatique des β -lactamines par les enzymes β -lactamases qui hydrolysent la liaison amide du cycle β -lactame, rendant l'antibiotique totalement inactif et régénérant l'enzyme pour une nouvelle réaction d'hydrolyse.

➤ **perméabilité réduite :**

Les bactéries sont capables de se protéger de l'action des antibiotiques en réduisant la concentration intracellulaire de ces derniers. Ce phénomène peut avoir lieu par :

- Une mutation affectant la structure des porines ou diminuant la synthèse des porines chez les bacilles à Gram négatif par lesquelles l'antibiotique peut pénétrer dans la bactérie.
- L'expulsion d'antibiotique vers le milieu extracellulaire par les pompes efflux.

➤ **Modification de la cible de l'antibiotique :**

La cible de l'antibiotique peut être structurellement modifiée, de telle sorte que le composé antibactérien ne puisse plus se lier et exercer son activité au niveau de la bactérie. Ce type de résistance peut être la conséquence d'une mutation au niveau de la séquence

nucléotidique de la cible (la résistance des *Pseudomonas aeruginosa* aux quinolones) ou de l'acquisition de matériel génétique mobile codant pour une enzyme modifiant la cible de l'antibiotique [10].

I.3. Méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne :

I.3.1. La méthode de diffusion sur disque :

La méthode de diffusion est l'une des plus vieilles approches de détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques et demeure l'une des méthodes les plus utilisées en routine. Elle consiste à diffuser un agent antimicrobien d'une concentration spécifique à partir de disques dans le milieu de culture solide, qui a été ensemencé avec l'inoculum choisi et isolé en culture pure. Après incubation, les disques s'entourent de zones d'inhibition dont le diamètre permet de mesurer la concentration minimale inhibitrice

I.3.2. Les méthodes de dilution :

Les méthodes de dilution sont effectuées en milieu liquide ou en milieu solide. Elles consistent à mettre un inoculum bactérien standardisé au contact de concentrations croissantes d'antibiotiques selon une progression géométrique de raison 2 :

➤ En milieu liquide :

La dilution en milieu liquide est une technique dans laquelle une suspension bactérienne est distribuée dans des tubes (méthode de macrodilution) ou dans de plaques de microtitration (méthode de microdilution) contenant des concentrations variables d'antibiotique à tester. Après incubation, la CMI est indiquée par le tube ou la plaque qui contient la plus faible concentration d'antibiotique où aucune croissance n'est visible.

➤ En milieu solide :

Dans cette méthode l'antibiotique est incorporé dans un milieu gélosé coulé en boîtes de pétri à des concentrations variables, suivie de l'ensemencement d'un inoculum des souches à étudier à la surface de la gélose. Après incubation, la CMI de chaque souche est déterminée par l'inhibition de la croissance sur le milieu contenant la plus faible concentration d'antibiotique [20].

I.3.3. La méthode de E – test :

L'E-test est une technique de diffusion en milieu gélosé introduite dans les années 1990. Techniquement, l'antibiotique est contenu dans un espace limité à une extrémité de la bandelette. Lorsque celle-ci est déposée sur une gélose Müller-Hinton préalablement ensemencée à l'aide d'un inoculum bactérien, l'antibiotique se répartit selon un gradient de

concentration très précis. La lecture est réalisée après 24 ou 48 heures d'incubation à 37 °C. Une ellipse d'inhibition de culture se dessine autour de la bandelette et la CMI correspond à la valeur lue à l'intersection de la culture bactérienne et de la bandelette [21].

Chapitre II
Étude de l'activité antioxydante

II.1. Les radicaux libres

II.1.1 Définition et types des radicaux libres :

Un radical libre est un atome ou une molécule dont la structure chimique est caractérisée par la présence d'un électron libre, rendant cette espèce chimique beaucoup plus réactive que l'atome ou la molécule dont elle est issue [22]. Cette espèce chimique est très instable et réagit rapidement avec d'autres composants, essayant de capturer l'électron nécessaire pour acquérir la stabilité, une réaction en chaîne débute lorsque la molécule attaquée perd son électron, et la molécule attaquée devient elle-même un radical libre [23]. Parmi les radicaux formés chez les êtres vivants : l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) résulte de la réduction de l'oxygène par différentes oxydases, en particulier par les NADPH-oxydases microsomiales et plasmatiques et la NADH-déshydrogénase mitochondriale [24], le monoxyde d'azote (NO^{\cdot}) résulte de la réaction entre le L- arginine et l'oxygène sous l'action catalytique des NO synthases [25], les deux radicaux sont peu réactifs mais peuvent déclencher des réactions en chaînes pour former des radicaux libres plus réactifs.

D'autres radicaux sont très réactifs comme les peroxydes (ROO^{\cdot}) et les hydroxyles (OH^{\cdot}) issus respectivement de l'oxydation des lipides et du clivage de peroxyde d'hydrogène par la réaction de Fenton ($H_2O_2 + Fe^{2+} (Cu^+) \rightarrow OH^{\cdot} + OH^{\cdot} + Fe^{3+} (Cu^{2+})$) ou par la réaction de Haber-Weiss ($H_2O_2 + O_2^{\cdot-} \rightarrow OH^{\cdot} + OH^{\cdot} + O_2$) [24]. Il existe d'autres espèces dérivées de l'oxygène telle que l'oxygène singulet (1O_2), le Peroxynitrite ($ONOO^{\cdot}$), l'acide hypochlorique ($HOCl$) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), ces espèces ne sont pas des radicaux libres, mais sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux. L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est appelé espèces ou formes réactives de l'oxygène (ERO) (tableau 01).

Tableau01 : Les différents types des espèces réactives de l'oxygène.

ERO radicalaire	ERO non radicalaire
$O_2^{\cdot-}$: anion superoxyde	1O_2 : oxygène singulet
OH^{\cdot} : radical hydroxyle	H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène
NO^{\cdot} : monoxyde d'azote	$ROOH$: hydroperoxyde organique
RO^{\cdot} : radical alkoxyde	$HOCl$: acide hypochlorique
ROO^{\cdot} : radical peroxyde	$ONOO^{\cdot}$: Peroxynitrite

II.1.2. Sources des radicaux libres :

La source principale des espèces réactives de l'oxygène dans les cellules des mammifères est d'origine enzymatique. La NADPH oxydase, les peroxysomes, la xanthine oxydase, les cyclooxygénases et les lipoxygénases sont parmi les sources endogènes d'ERO les plus importantes. La mitochondrie, organite intracellulaire responsable de la production de l'énergie sous forme d'ATP, produit également en permanence des ERO. Les ERO peuvent être également générées sous l'effet des facteurs exogènes comme les rayonnements, l'ingestion d'alcool ou de médicaments, ainsi que le tabagisme.

II.1.3. Rôles physiologique des radicaux libres :

Du fait de l'importance de l'oxygène dans les systèmes biologiques, en situation physiologique, les espèces réactives sont créées en continu dans l'organisme. Ainsi, les radicaux libres générés de façon permanente par le métabolisme normal de l'oxygène, ne sont pas seulement des produits dangereux mais aussi des produits possédant également des propriétés bénéfiques indispensables à l'homéostasie cellulaire. Ils participent au fonctionnement de certaines enzymes, à la transduction de signaux cellulaires, à la défense immunitaire contre les agents pathogènes, à la destruction par apoptose des cellules tumorales, à la régulation de la dilatation capillaire, au fonctionnement de certains neurones et notamment ceux de la mémoire, à la fécondation de l'ovule et à la régulation des gènes [26]. Parmi les radicaux qui confèrent un rôle bénéfique pour l'organisme on trouve le monoxyde d'azote (NO^{\cdot}) qui exerce des effets régulateurs sur la plupart des fonctions physiologiques (neurotransmission, réguler le tonus des vaisseaux sanguins dans les systèmes vasculaires et un effecteur de défense du hôte important du système immunitaire) [25], et l'oxygène singlet qui possède un potentiel thérapeutique pour lutter contre des pathogènes variés comme les bactéries, les virus et même les cellules cancéreuses [27].

II.2. Stress oxydant :

II.2.1. Définition :

Dans les circonstances quotidiennes normales, des radicaux libres sont produits en permanence et en faible quantité et cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense, d'ailleurs adaptatifs par rapport au niveau de radicaux présents. Dans ces circonstances normales, on dit que la balance antioxydants/pro-oxydants est en équilibre. Si tel n'est pas le cas, que ce soit par déficit en

antioxydants ou par suite d'une surproduction énorme de radicaux, l'excès de ces radicaux est appelé stress oxydant. Le stress oxydant donc correspond à un déséquilibre entre la génération d'espèces oxygénées activées (pro-oxydants) et les défenses antioxydantes de l'organisme (Figure 09) [28].

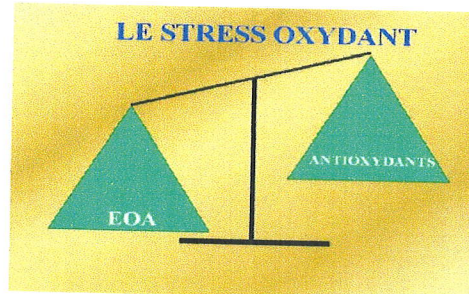


Figure 09 : Déséquilibre de la balance entre antioxydants et les ERO.

II.2.2. Les conséquences du stress oxydant :

La production excessive des radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques : oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides et des glucides :

➤ Oxydation de l'ADN :

L'ADN est une cible privilégiée pour les ERO, cinq classes principales de dommages oxydatifs médiées par le radical hydroxyle peuvent être générées : les bases oxydées, les sites basiques des adduits intra-caténaux, des cassures de brins et des pontages ADN-protéines. L'attaque radicalaire de l'ADN peut être directe et entraîner l'oxydation des bases, engendrant un grand nombre de bases modifiées et indirect peut résulter de l'attaque des lipides dont la peroxydation génère des aldéhydes mutagènes, formant des adduits sur les bases de l'ADN de type MDA-guanine ou éthénodérivés [26]. Ces lésions de l'ADN entraînent de graves altérations du matériel génétique comme des mutations à l'origine de cancer.

➤ Oxydation des protéines :

A cause de leur abondance dans l'organisme, les protéines et surtout celles qui comportent un groupement sulfhydryle (SH) sont une cible importante des ERO. Les modifications oxydatives des protéines provoquent l'introduction d'un groupement carbonyle dans la protéine. Ces réactions d'oxydation, fréquemment influencées par les cations métalliques peuvent être classées en deux catégories : celles qui cassent les liaisons peptidiques et modifient les chaînes latérales des protéines, et les modifications des peptides par l'addition de produits issus de l'oxydation des glucides et de lipides. En effet,

les protéines modifiés par oxydation perdent leurs fonctions catalytiques ou structurelle [29].

➤ **Oxydation des lipides :**

Les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par les EOR et en particulier du radical hydroxyle. En effet, ils sont capables d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons, pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxyde .Cette réaction appelée peroxydation lipidique se déroule en plusieurs étape, l'initiation, propagation, et terminaison.

La peroxydation de lipides fournit également une grande variété de produits présentent une forte réactivité telles que l'isoprostane, les acides thiobarbiturique (TBARS) et les aldéhydes (malondialdéhyde (MDA), 4-hydroxynonéal (4-HNE)) qui peuvent réagir avec les protéines et l'ADN.

➤ **Oxydation des glucides :**

Le glucose peut s'oxyder dans des conditions physiologiques, en présence de traces métalliques, en libérant des cétoaldéhydes, H_2O_2 et OH^\bullet , qui entraîneront la coupure de protéines ou leur glycation par attachement du cétoaldéhyde, formant un dérivé des produits de glycation avancée (AGE).

Ce phénomène de glycosoxydation est très important chez les diabétiques et contribue à la fragilité de leurs parois vasculaires et de leur rétine [26].

II.2.3. Les antioxydants :

II.2.3.1. Définition :

Au cours de l'évolution, les organismes aérobies dans l'homme se sont adaptés pour contrer les effets délétères du stress oxydant, notamment par la mise en place de systèmes de défense appelés antioxydants. Le terme antioxydant est définie par B.Halliwell comme «toute substance qui en faible concentration par rapport au substrat susceptible d'être oxydé prévient ou ralentit l'oxydation de ce substrat» [30]. Il s'agit donc d'ensemble des molécules susceptibles d'inhiber directement la production, de limiter la propagation ou de détruire les espèces réactives de l'oxygène.

La réaction des antioxydants avec les radicaux libres sont effectuées selon deux mécanismes essentiels ; le transfert d'électron singlet et le transfert d'atome d'hydrogène.

II.2.3.2. Classification et mécanisme d'action des antioxydants :

L'organisme dispose des systèmes de protection contre les ERO. La protection antioxydante comprend deux grands systèmes : les antioxydants enzymatiques et les antioxydants non enzymatiques endogènes et exogènes.

II.2.3.2.1. Les antioxydants enzymatiques :

Notre organisme possède des systèmes antioxydants naturels. Les principaux mécanismes de défenses sont constitués par des enzymes : le superoxyde dismutase, la catalase, la glutathion peroxydase et la glutathion réductase qui sont considérés comme la première ligne de défense contre les radicaux oxygénés (Tableau 02).

Tableau 02 : Principales enzymes du système de défenses antioxydants enzymatiques.

Enzyme	Localisation	Propriétés
Superoxyde dismutase(SOD)	Cytosol, noyau	Catalyse la dismutation de $O_2^{\cdot -}$ en H_2O_2 et O_2
Catalase(CAT)	Peroxisomes	Catalyse la conversion du H_2O_2 en H_2O et en O_2
Glutathion peroxydase (GPx)	Cytosol et mitochondries	Catalyse la conversion du H_2O_2 et de ROOH en H_2O et ROH respectivement
Glutathion réductase (GR)	Cytosol et mitochondries	Catalyse la réduction de GSSH en GSH

II.2.3.2.2. Antioxydants non enzymatiques :

➤ Les antioxydants endogènes :

• Glutathion (GSH):

Le glutathion est un tripeptide, formé par la condensation de l'acide glutamique, de la cystéine et de la glycine, dont la présence de fonction thiol confère au glutathion un rôle d'antioxydant (Figure 10) [31].

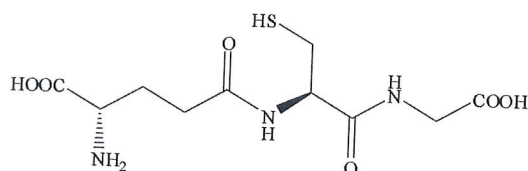


Figure 10: Structure chimique de glutathion.

Le rôle de glutathion comme un antioxydant est liée à sa capacité de piéger directement des radicaux hydroxyyles(OH^{\cdot}) et de l'oxygène singulet (1O_2), de détoxifier

les peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et les hydroperoxydes lipidiques (LOOH), sous l'action catalytique de glutathion peroxidase .

De plus le glutathion est un cofacteur de plusieurs enzymes détoxifiant contre le stress oxydatif comme le glutathion peroxydase (GPx), glutathion transférase, il est aussi capable de régénérer les plus importants antioxydants; le vitamine C et le vitamine E. [32].

• **Bilirubine :**

La bilirubine est un produit terminal de la dégradation de l'hème et résulte essentiellement du catabolisme de l'hémoglobine par les cellules réticuloendothéliales. Elle réagit avec les ERO, neutralise sa toxicité et se transforme en biliverdine qui est ensuite réduite par la biliverdine réductase (BVR) en bilirubine en utilisant le NADPH [33].

• **Coenzyme Q10 :**

Le coenzyme Q10, appelé ubiquinone en raison de son ubiquité dans les cellules, c'est un dérivé benzoquinolique avec une longue chaîne latérale isoprénique (Figure 11). Cette chaîne latérale confère à la molécule un caractère lipophile qui lui permet de s'insérer dans les membranes et les lipoprotéines, et donc d'inhiber la peroxydation lipidique en empêchant la production de radicaux peroxydes de lipides ($LOO\cdot$) [34].

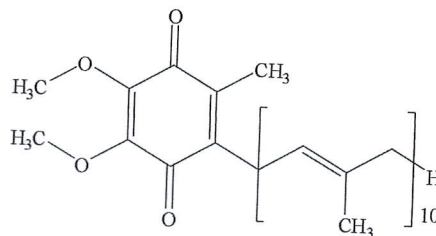


Figure 11 : structure chimique de coenzyme Q10.

• **Acide urique**

L'acide urique est le produit final du métabolisme des purines chez l'homme. Á pH physiologique l'acide urique est majoritairement ionisé sous forme d'urate, un piègeur puissant de radicaux de l'oxygène singulet (1O_2), des radicaux peroxydes ($ROO\cdot$), des radicaux hydroxydes ($OH\cdot$) [35], et protecteur des acides gras insaturés contre l'oxydation.

L'importance de l'acide urique réside non seulement dans le fait qu'on trouve dans tous les liquides et les tissus organiques, mais aussi sa concentration plasmatique (150-450 $\mu\text{mol/l}$) qui est beaucoup plus élevée que celle d'autres antioxydants [36].

➤ **Les antioxydants exogènes :**

• **La vitamine E :**

La vitamine E ou α -tocophérol est un antioxydant liposoluble majeur présent dans les membranes lipidiques et les lipoprotéines du plasma humain. In vivo, elle fonctionne comme un puissant protecteur contre la peroxydation lipidique [34]. La partie active de la molécule étant la fonction phénol réductrice (Figure 12).

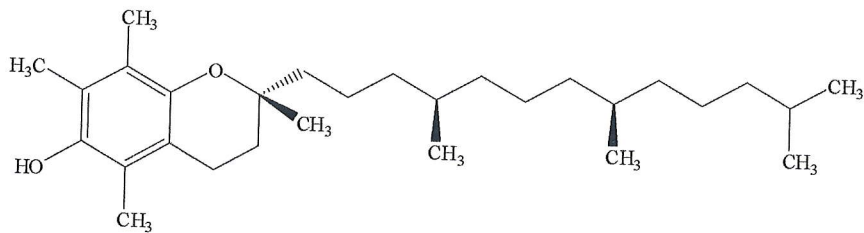


Figure 12 : Structure chimique de vitamine E.

Le recyclage de la vitamine E par des systèmes réducteurs dont le plus important est l'ascorbate, lui permet de jouer son rôle d'antioxydant à plusieurs reprises.

• **La vitamine C :**

La vitamine C ou acide ascorbique est une vitamine hydrosoluble majoritairement présente dans le milieu physiologique sous forme ionisée l'ascorbate (AscH^-). Son structure contenant deux groupes hydroxyles adjacents et un carbonyle rend cette molécule un excellent donneur d'hydrogène ou d'électron (Figure13) [37].

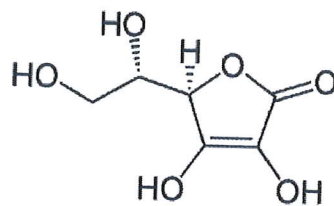


Figure 13 : Structure chimique de vitamine C.

La vitamine C agit directement comme un excellent piègeur de radicaux libres oxygénés dont les radicaux hydroxyles OH^\cdot , les radicaux superoxydes $\text{O}_2^{\cdot-}$, et les radicaux peroxydes ROO^\cdot , et indirectement par son action de régénération de deux autres antioxydants, le glutathion et l' α -tocophérol à partir de leurs formes radicalaires [31].

• Les caroténoïdes :

Les caroténoïdes sont des pigments issus des plantes et microorganismes, et sont regroupés en deux grandes familles : les carotènes (β -carotène) et les xanthophylles (zéaxanthine) (Figure14). Le chef de file des caroténoïdes est le β -carotène, également appelé provitamine A. L'activité antioxydante de ceux-ci est liée à leur longue chaîne polyénique qui leur permet de réagir avec les radicaux libres tels que les radicaux peroxy ($\text{ROO}\cdot$), le radical hydroxyle ($\cdot\text{OH}$), et le radical superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Ils permettent, en particulier, de désactiver l'oxygène singulet [38].

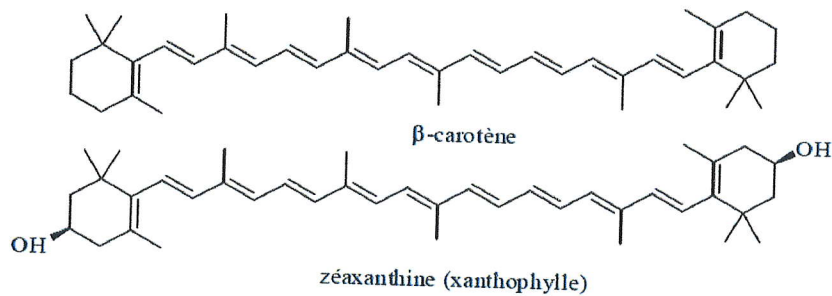


Figure14 : Exemples de carotène et xanthophylle.

• Les polyphénols :

Les polyphénols et en particulier les flavonoïdes, sont présents dans la plupart des plantes. Selon la structure chimique, plus de 4000 flavonoïdes ont été identifiées et classées en flavanols, flavanones, flavones, isoflavones, catéchines, anthocyanes, proanthocyanidines [39]. Leur efficacité antioxydante réside dans leur capacité à « terminer » les chaînes radicalaires, à chélater les ions des métaux de transition capables de catalyser la peroxydation lipidique [38], à réduire les radicaux de l'alpha-tocophérol, à activer les enzymes antioxydants [40] et à inhiber de l'activité de certaines enzymes responsables de la production des ERO comme la xanthine oxydase et NO-oxydase [41].

II.3. Quelques méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante :

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer, *in vitro* et *in vivo*, l'activité antioxydante par piégeage de radicaux différents, parmi lesquelles on trouve :

III.3.1. Test de piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH \cdot) :

La réduction du radical libre DPPH $^{\circ}$ (2,2'-diphényle-1-picryl hydrazyl) par un antioxydant peut être suivie par un spectrophotomètre, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm provoquée par les antioxydants [42]. En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH. (2.2 diphényl -1- picrylhydrazyl) de couleur violette se réduit en

2.2 diphenyl -1- picrylhydrazine de couleur jaune. (Figure 15). Ce test est recommandé pour des composés contenant les groupes SH, NH et OH.

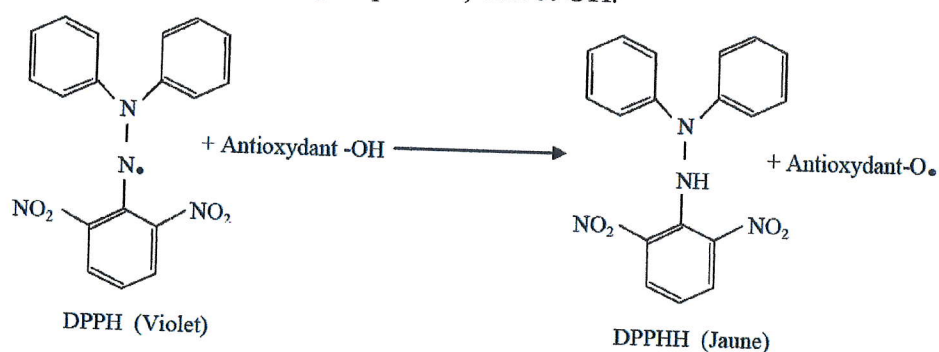


Figure 15 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.

III.3.2. Test de piégeage du radical- cation (ABTS⁺):

Cette méthode permet de mesurer la capacité relative d'antioxydant pour piéger le ABTS⁺ générée en phase aqueuse, par rapport à un antioxydant de référence : le Trolox un analogue de vitamine E. L'analyse est basée sur l'interaction entre les antioxydants et le radical -cation ABTS qui a une couleur caractéristique bleu-vert à 734 nm. Le radical ABTS⁺ est obtenu après réaction de l'ABTS (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline- 6-sulfonique) avec un oxydant fort (permanganate de potassium ou persulfate de potassium). La réduction du ABTS⁺ de coloration bleu-vert par un antioxydant donneur d'hydrogène conduit à la formation de ABTS⁺ et à la décoloration de la solution à 734 nm.

II.3.3. Test de la réduction du fer FRAP (Ferric reducing-antioxidant power) :

Cette technique mesure la capacité d'un antioxydant à réduire le fer ferrique (Fe³⁺) en fer ferreux (Fe²⁺) dans une réaction basée sur le mécanisme de transfert d'électron. Il s'agit d'une technique spectrophotométrique simple, peu coûteuse qui a été initialement appliquée au plasma mais a été étendue aux autres liquides biologiques, les aliments, les extraits de plantes et les jus [43]. En effet le Fe³⁺ participe à la formation du radical hydroxyle par la réaction de Fenton. Le Fe²⁺ à un pH faible (PH optimal = 3,6) forme un complexe avec la 2,4,6-tri (2-pyridyl)-1,3,5-s-triazine (TPTZ) [Fe²⁺-TPTZ] de couleur bleu foncé qui a une absorption maximale à 594 nm. Ainsi, la formation de ce complexe indiquera un pouvoir réducteur qui détermine la capacité d'un composé à se comporter comme un antioxydant. Les valeurs obtenues sont comparées avec l'absorbance d'un témoin qui est l'acide ascorbique usuellement.

III.3.4. Chélation du fer :

Pour évaluer le pouvoir chélateur d'un extrait donné, le composé stabilisant le plus utilisé est la ferrozine. En effet, la ferrozine forme avec les ions ferreux un complexe ferrozine-Fe²⁺ de couleur rouge [44]. La quantification de ce complexe par spectrophotométrie à 562 nm dans un milieu de concentration connue en fer, renseigne sur la quantité de fer non chélaté et donc sur la capacité des antioxydants à chélater cet élément. Plus la coloration de la solution contenant l'extrait testé est claire, plus le pouvoir chélateur est important.

Partie II
Partie Expérimentale

Chapitre I

Évaluation de l'activité antibactérienne et antioxydante

L'évaluation de l'activité antibactérienne et antioxydant des benzothiazoles portant une fonction urée ou thiourée a été réalisée à l'aide de la méthode de diffusion sur disque et la méthode de piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl respectivement.

Cette étude a été réalisée au niveau de laboratoire de pharmacologie et de phytochimie à la faculté des sciences exactes et informatiques de l'université de Jijel.

I.1. Matériels :

I.1.1. Matériel biologique :

Les souches utilisées pour évaluer l'activité antibactérienne des produits font partie de quatre genres de microorganismes, dont trois sont des souches cliniques isolées des prélèvements humains (urines) et identifiées au niveau du laboratoire de Bekioua-Jijel. Il s'agit de : *Escherichia coli*, *klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus saprophytus*, la quatrième souche, *Listéria monocytogene* (ATCC 15313), est une souche référentielle de l'American Type Culture Collection.

➤ Description des bactéries étudiées :

a- *Staphylococcus saprophytus* :

Est une espèce de bactéries de staphylocoque, il se trouve normalement sur la peau. Elle s'agit de cocci à Gram positif, aérobie anaérobie facultative responsable d'infections du tractus urinaire principalement chez la jeune femme. Elle présente une résistance naturelle à la novobiocine et à la fosfomycine [45].

b- *Listeria monocytogenes*

L. monocytogene sont des petits bacilles à Gram positif, extrémités arrondies, non sporulés, mobiles à 20-25°C. Elles sont des germes ubiquitaires, très résistantes au milieu extérieur et sont aussi des hôtes des êtres vivants. Leur voie de transmission vers l'homme est principalement la voie alimentaire. Le *L. monocytogenes* est responsable de trois d'infections chez l'homme : *Listeriose de l'adulte et de l'enfant* (méningites, méningo-encéphalites, encéphalites, septicémie), *Listeriose de la femme enceinte*, (infection bénigne), et *Listeriose néonatale* (septicémie, méningite).

c- *Klebsiella pneumoniae*

K. pneumoniae est une entérobactérie appartenant au genre klebsiella. Il s'agit d'un bacille à Gram négatif, immobile, et non sporulé, commensale de l'homme et des animaux. C'est un agent classique et majeur d'infections nosocomiales en général et néonatales particulièrement ; elle provoque des infections urinaires, d'infections hépatovésiculaires

d'infections opportunistes chez les malades hospitalisés et des surinfections des bronches chez les bronchitiques chroniques, voire des abcès du poumon [7].

d- Escherichia coli

Escherichia coli (colibacille) est une entérobactérie que l'on trouve couramment dans le tube digestif de l'homme et des grands mammifères herbivores, son transmission à l'homme passe principalement par la consommation ou la manipulation d'aliments contaminés. Il y a des souches d'*E. coli* qui sont inoffensifs commensaux du tube digestif et d'autres qui sont les principaux agents pathogènes pour les humains et les animaux [46].

L'*E. coli* pathogène sont responsable de plusieurs types d'infections chez l'homme comme l'infections de l'arbre urinaire, méningites et septicémies, infections urinaires et plus souvent des diarrhées aiguës qui se complique fréquemment d'une colite hémorragique [7].

I.1.2. Milieux de culture :

- La gélose nutritive : pour l'isolement et l'entretien des souches bactériennes;
- La gélose Mueller Hinton : pour l'étude de la sensibilité des bactéries.
- L'eau physiologique (0,9%) : pour la préparation de l'inoculum.

I.1.3. Réactifs chimiques et solvants : DPPH[•] (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl), l'acide ascorbique, le méthanol et le diméthylsulfoxyde (DMSO).

I.1.4. Produits testés :

Nous avons testé 30 composés de quelques dérivés de benzothiazoles portant une fonction urée ou thiourée en position 2, synthétisées par *K. Harrouche* :

a)- Les produits sélectionnés pour le test de l'activité antibactérienne :

Série A : H21, H211.

Série B : H32, H33, H45, H46, H51, H52, H53, H54, H55, H57, H58, H59, H61, H63, H66, H72, H74, H411, H511.

b)- Les produits sélectionnés pour le test de l'activité antioxydante :

Série A : H21, H22, H210, H211.

Série B : H31, H32, H33, H35, H43, H49, H51, H52, H54, H55, H58, H61, H66, H67, H72, H74, H76, H411, H511, H620.

I.2. Méthodes :

I.2.1. Le test de l'activité antibactérienne :

Pour étudier l'activité antibactérienne, nous avons réalisés un antibiogramme qui permet de prédire la sensibilité d'un germe à un ou plusieurs antibiotiques.

L'antibiogramme a été réalisé par la méthode de diffusion sur disque dont les étapes sont comme suivant :

I.2.1.1. Préparation des solutions testées :

Les composés à tester, sous forme de poudre, ont été solubilisés dans le diméthylsulfoxyde (DMSO). Dans la première étape, une solution mère de concentration de 1mg/ml a été préparée par la dissolution de 1mg de chaque composé à tester dans 1 ml de DMSO, à partir de cette concentration on prépare ensuite une gamme de concentration par la méthode de dilution de deux en deux afin de déterminer la CMI de ces produits (Tableau03).

Tableau03 : Préparation de la solution mère et les solutions filles.

Solution à tester	S _m	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄
Concentration (mg/ml)	1	0.5	0.25	0.125	0.0625
Volume totale (ml)	1	1	1	1	1

A côté des solutions préparées, deux témoins sont réalisés pour cette technique : un témoin négatif avec le DMSO et un témoin positif avec l'antibiotique « Ciprofloxacine ».

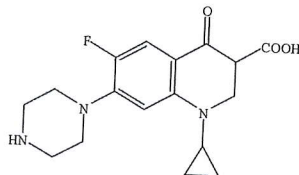


Figure 16 : Structure chimique de la Ciprofloxacine.

I.2.1.2. Repiquage des souches bactériennes :

Les souches bactériennes à tester ont été cultivées dans des boîtes de pétrie contenant de la gélose nutritive, puis incubées à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures afin d'obtenir une culture jeune et des colonies isolées. Les colonies isolées ont servi à préparer l'inoculum.

I.2.1.3. Préparation des disques :

Les disques sont préparés à partir de papier Wattman n°3, avec un diamètre de 6 mm. Une fois préparés, ils sont mis dans un tube à essai (ou plus si nécessaire) et stérilisés.

I.2.1.4. Préparation de l'inoculum :

A partir d'une culture pure des bactéries utilisée sur milieu d'isolement (ayant au maximum 24h), racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et

Tableau 01 : Le pourcentage d'inhibition de l'acide ascorbique.

Concentration (µg/ml)	5	10	30	50	100	200	400	600	1000
A ₁	0.570	0.547	0.516	0.439	0.329	0.038	0.030	0.028	0.023
PI ₁ (%)	3.06	6.97	12.24	25.34	44.07	93.54	94.89	95.23	96.09
A ₂	0.577	0.572	0.516	0.432	0.323	0.038	0.025	0.024	0.022
PI ₂ (%)	1.87	2.72	12.24	26.53	45.07	93.54	95.75	95.91	96.25
A ₃	0.566	0.567	0.507	0.419	0.329	0.031	0.024	0.021	0.022
PI ₃ (%)	3.74	3.57	13.77	28.74	44.05	94.73	95.91	96.43	96.25

Tableau 02 : Le pourcentage d'inhibition de produit H21.

Concentration (µg/ml)	5	10	30	50	100	200	400	600	1000
A ₁	0.535	0.525	0.491	0.455	0.281	0.122	0.046	0.044	0.044
PI ₁ (%)	8.23	9.95	15.78	21.96	51.80	79.07	92.11	92.45	92.45
A ₂	0.542	0.523	0.503	0.445	0.284	0.099	0.048	0.047	0.034
PI ₂ (%)	7.03	10.29	13.72	23.67	51.28	83.02	91.77	91.94	94.17
A ₃	0.546	0.521	0.486	0.445	0.280	0.119	0.042	0.041	0.035
PI ₃ (%)	6.35	10.63	16.64	23.67	51.97	97.59	92.79	92.97	93.99

Tableau 03 : Le pourcentage d'inhibition de produit H210.

Concentration (µg/ml)	5	10	30	50	100	200	400	600	1000
A ₁	0.553	0.556	0.518	0.482	0.385	0.263	0.040	0.034	0.027
PI ₁ (%)	5.15	4.63	11.15	17.32	33.96	54.88	93.14	94.16	95.37
A ₂	0.564	0.555	0.504	0.464	0.391	0.240	0.032	0.032	0.028
PI ₂ (%)	3.26	4.80	13.55	20.41	32.93	58.83	94.15	94.51	95.20
A ₃	0.564	0.560	0.462	0.458	0.381	0.244	0.052	0.030	0.028
PI ₃ (%)	3.564	3.95	21.27	21.44	34.65	58.15	91.08	94.85	95.20

Tableau 04 : Le pourcentage d'inhibition de produit H620.

Concentration (µg/ml)	5	10	30	50	100	200	400	600	1000
A ₁	0.577	0.569	0.550	0.536	0.483	0.359	0.208	0.163	0.057
PI ₁ (%)	1.03	2.40	5.66	8.06	17.15	38.42	64.32	72.04	90.22
A ₂	0.576	0.570	0.552	0.532	0.484	0.382	0.208	0.120	0.084
PI ₂ (%)	1.20	2.22	5.32	8.75	16.98	34.48	64.32	79.42	85.59
A ₃	0.568	0.574	0.556	0.539	0.482	0.389	0.210	0.140	0.083
PI ₃ (%)	2.57	1.54	4.63	7.55	17.32	33.28	69.98	75.99	85.76

Tableau 05 : Le pourcentage d'inhibition de produit H61.

Concentration (µg/ml)	5	10	30	50	100	200	400	600	1000
A ₁	0.612	0.615	0.594	0.581	0.553	0.477	0.331	0.242	0.131
PI ₁ (%)	1.77	1.28	4.65	6.74	11.24	23.43	46.87	61.16	78.97
A ₂	0.607	0.614	0.588	0.580	0.550	0.478	0.298	0.242	0.132
PI ₂ (%)	2.57	1.44	5.62	6.90	11.72	23.27	52.17	61.16	78.81
A ₃	0.615	0.613	0.567	0.567	0.548	0.476	0.316	0.236	0.129
PI ₃ (%)	1.28	1.61	8.99	8.99	12.04	23.60	49.28	62.12	79.29

Tableau 06 : Le pourcentage d'inhibition de produit H411.

Concentration (µg/ml)	5	10	30	50	100	200	400	600	1000
A ₁	0.572	0.572	0.546	0.512	0.462	0.354	0.309	0.220	0.069
PI ₁ (%)	2.72	2.72	7.14	12.93	21.43	39.79	47.45	62.85	88.27
A ₂	0.574	0.570	0.547	0.508	0.454	0.351	0.244	0.184	0.092
PI ₂ (%)	2.38	3.06	6.97	13.61	22.79	40.31	58.50	68.71	84.35
A ₃	0.576	0.571	0.547	0.511	0.462	0.362	0.271	0.197	0.071
PI ₃ (%)	2.04	2.89	6.97	13.09	21.43	38.43	53.91	66.50	87.93

Tableau 07 : Le pourcentage d'inhibition de produit H74.

Concentration (µg/ml)	5	10	30	50	100	200	400	600	1000
A ₁	0.621	0.612	0.575	0.543	0.466	0.386	0.350	0.333	0.037
PI ₁ (%)	0.32	1.77	7.70	12.84	25.20	38.04	43.82	46.54	94.06
A ₂	0.618	0.608	0.573	0.543	0.485	0.366	0.267	0.291	0.037
PI ₂ (%)	0.80	2.41	8.03	12.84	22.15	41.25	57.14	52.29	94.06
A ₃	0.616	0.607	0.573	0.528	0.486	0.367	0.297	0.057	0.037
PI ₃ (%)	1.12	2.57	8.03	15.24	21.99	41.09	52.33	90.85	94.06

Tableau 08 : Le pourcentage d'inhibition de produit H51.

Concentration (µg/ml)	5	10	30	50	100	200	400	600	1000
A ₁	0.523	0.533	0.482	0.437	0.363	0.225	0.107	0.035	0.031
PI ₁ (%)	4.39	2.56	11.88	20.11	33.64	58.87	80.44	93.60	94.33
A ₂	0.533	0.537	0.479	0.440	0.351	0.196	0.094	0.032	0.032
PI ₂ (%)	2.56	1.83	12.43	19.56	35.83	64.17	82.82	94.15	94.14
A ₃	0.527	0.532	0.476	0.430	0.354	0.194	0.093	0.030	0.031
PI ₃ (%)	3.66	2.74	12.98	21.39	32.28	64.53	82.99	94.52	94.33

Tableau 09 : Le pourcentage d'inhibition de produit H511.

Concentration (µg/ml)	5	10	30	50	100	200	400	600	1000
A ₁	0.575	0.577	0.534	0.501	0.434	0.295	0.039	0.039	0.037
PI ₁ (%)	2.54	2.20	9.49	15.08	26.44	50	93.39	93.39	93.56
A ₂	0.579	0.571	0.539	0.498	0.420	0.333	0.040	0.036	0.037
PI ₂ (%)	1.86	3.22	8.64	15.59	28.81	43.56	93.22	93.90	93.73
A ₃	0.581	0.559	0.502	0.498	0.419	0.286	0.038	0.038	0.038
PI ₃ (%)	1.53	5.25	14.92	15.59	28.98	51.53	93.56	93.56	93.73

Tableau 10 : Le pourcentage d'inhibition de produit H58.

Concentration (µg/ml)	5	10	30	50	100	200	400	600	1000
A ₁	0.559	0.570	0.555	0.545	0.525	0.477	0.359	0.253	0.106
PI ₁ (%)	4.12	2.22	4.80	6.52	9.95	18.18	38.42	56.60	81.81
A ₂	0.576	0.571	0.556	0.540	0.522	0.447	0.353	0.194	0.080
PI ₂ (%)	1.20	2.06	4.63	7.38	10.46	23.33	39.45	66.72	86.28
A ₃	0.576	0.568	0.557	0.465	0.465	0.467	0.342	0.273	0.095
PI ₃ (%)	1.20	2.57	4.46	20.24	20.24	19.89	41.33	53.17	83.70

مخلص :

مضمون هذا العمل هو تقييم النشاط المضاد للبكتيريا و النشاط المضاد للأكسدة لمشتقات البنزوثيازول الحاملة للوظيفة يوري أو تيوري . اظهر اختبارا لنشاط المضاد للبكتيريا على 4 سلالات بكتيرية : *Staphylococcus saprophytus*, *Listéria monocytogen*, *klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli* الانتشار على الأقراص متأثرا مثبتا على بعض هذه السلالات بالنسبة للمجموعتين A و B أين سجل ادنى تركيز مثبت و الذي قدر ب 0.0625 مغ/مل لكلا المجموعتين مع البكتيريا *klebsiella pneumonie*. فيما يخص اختبار النشاط المضاد للأكسدة و الذي قدر بطريقة إرجاع الجدر الحر أثبتت النتائج فعالية المركبات الحاملة للوظيفة تيوري اين تراوحت قيم التراكيز المثبطة ل 50% من الجدر الحر DPPH بين 100 و 500 مع تسجيل ادنى قيمة مع مركب المجموعة A (H21) , في حين لم يتم تسجيل اي نشاط مضاد للأكسدة بالنسبة للمركبات الحاملة للوظيفة يوري.

الكلمات المفتاحية : البنزوثيازول, النشاط المضاد للأكسدة, النشاط المضاد للبكتيريا, التركيز المثبط الأدنى .

Résumé

Le Contenu de ce travail est l'évaluation de l'activité antibactérienne et l'activité antioxydante des dérivés de benzothiazoles portant des fonctions urée et thiourée. Le test de l'activité antibactérienne réalisé par la méthode de diffusion sur disque vis-à-vis de quatre souches bactériennes : *Staphylococcus saprophytus*, *Listéria monocytogene*, *klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli* apparait un effet inhibitrice sur certaines souches pour les deux séries A et B, où la concentration minimale inhibitrice de 0.0625 mg/ml a été enregistré pour les deux séries avec la bactérie de *klebsiella pneumoniae*. Pour le test de l'activité antioxydante qui a été estimé par la méthode de réduction de radical libre DPPH, les résultats montrent l'efficacité des composés portant la fonction thiourée où les valeurs des concentrations minimales inhibitrices de 50% du radical libre sont variées entre 100 et 500 µg/ml avec l'enregistrement de faible valeur avec le composé de la série A (H21), tandis que pour les composés portant la fonction urée, aucun effet a été enregistré.

Mots clés : Benzothiazole, activité antibactérienne, activité antioxydante, concentration minimale inhibitrice.

Abstract

The content of this work is the evaluation of the antibacterial activity and the antioxidant activity of the benzothiazole derivatives bearing urea and thiourea functions. The antibacterial activity of the four bacterial strains: *Staphylococcus saprophytus*, *Listeria monocytogenes*, *klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* is shown to have an inhibitory effect on some strains in both A and B series, Or the minimum inhibitory concentration of 0.0625 mg / ml was recorded for both series with the *klebsiella pneumoniae* bacteria. For the test of the antioxidant activity which was estimated by the free radical reduction method DPPH, the results show the effectiveness of the compounds carrying the thiourea function . The values of the minimum inhibitory concentrations of 50% of the free radical are varied between 100 and 500 µg / ml with the low value recording with the compound of the A series (H21), while for compounds carrying the urea function, none effect has been recorded.

Key words : Benzothiazol, antibacterial activity , antioxidant activity, inhibiting minimal concentration.